

09/926566

Rec'd PCT/PTO 19 NOV 2001

DOCKET NO.: 216120US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroshi KAYAHARA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/03135

INTERNATIONAL FILING DATE: May 16, 2000

FOR: PROLYLENDOPEPTIDASE INHIBITORS

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

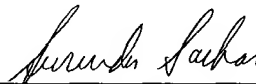
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	11/138791	19 May 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP00/03135**.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

DOCKET NO.: 216120US0PCT

09/926566
JC17 Rec'd PCT/PTO 19 NOV 2001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroshi KAYAHARA, et al.
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HERewith
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/03135
INTERNATIONAL FILING DATE: May 16, 2000
FOR: PROLYLENDOPEPTIDASE INHIBITORS

REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT

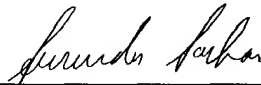
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 7 0 5 0 0 5 9]

1. 変更年月日	1 9 9 7 年 3 月 2 5 日
[変更理由]	新規登録
住 所	長野県上田市大字古安曾 3 5 0 7
氏 名	ドーマー株式会社

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の提供

【解決手段】 穀類の抽出物を有効成分として含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法、穀類から抽出・精製されたプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する化合物、該化合物の製造方法、該化合物を含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該化合物を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品、プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する脳機能障害予防用及び／又は改善用発芽玄米、及び該発芽玄米を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品。

【選択図】 なし

【書類名】 図面

【図 1】

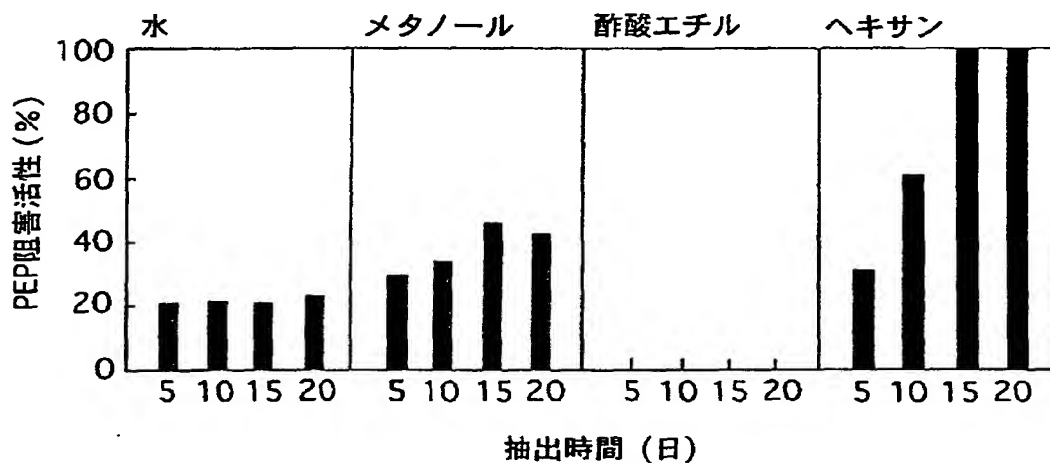
サブスタンスP Arg-Pro-Lys-Pro↓Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂

ニューロテンシン Prr-Leu-Tyr-Gln-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro↓Tyr-Ile-Leu

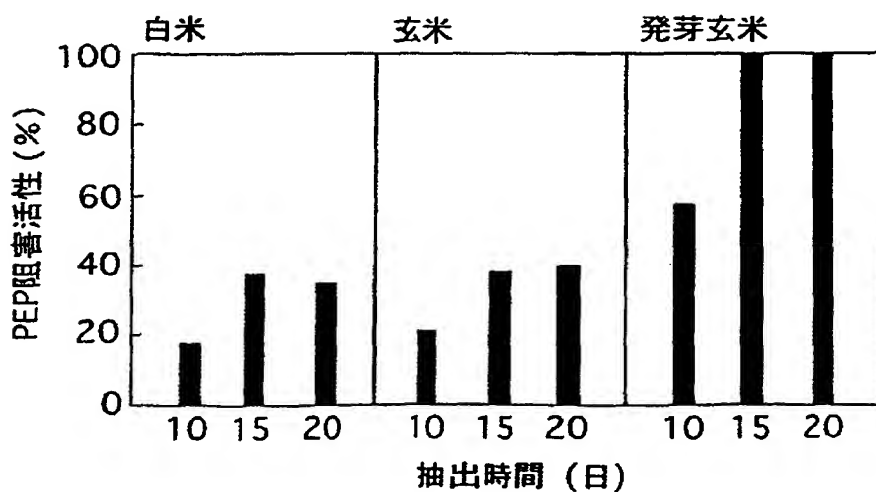
バソプレッシン Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro↓Arg-Gly-NH₂

オキシトシン Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro↓Leu-Gly-NH₂

【図 2】



【図 3】



のことから、玄米が発芽する段階で、PEP阻害能を有する物質が増加したか、又はPEP阻害能を有する物質が新たに産生されたことが考えられる。また、玄米と白米にはPEP阻害活性に差は認められなかったが、白米からの抽出量は玄米と発芽玄米からの抽出量に比べ、50%位であるため、PEP阻害能を有する物質は白米より玄米に多く含まれていることがわかった。

【0051】

【発明の効果】

本発明により、穀類の抽出物を有効成分として含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法、穀類から抽出・精製されたプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する化合物、該化合物の製造方法、該化合物を含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該化合物を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品、プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する脳機能障害予防用及び／又は改善用発芽玄米、及び該発芽玄米を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品が提供される。本発明は、脳機能障害(例えば、痴呆症、健忘症など)の患者の症状の軽減に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

プロリルエンドペプチダーゼによる脳機能性ペプチドの分解点を示した図である。

【図2】

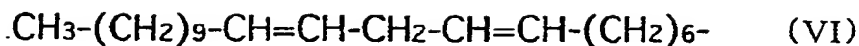
発芽玄米の各種溶媒抽出物中のPEP阻害活性と抽出時間との関係を示す図である。

【図3】

白米、玄米及び発芽玄米のn-ヘキサン抽出物中のPEP阻害活性と抽出時間との関係を示す図である。

【 0 0 4 5 】

【化 9】



【 0 0 4 6 】

【化 1 0】

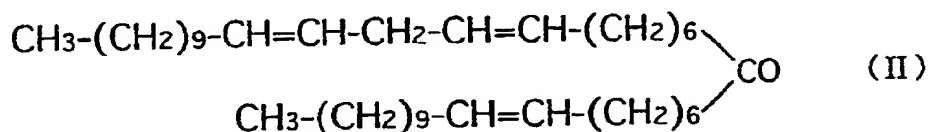


【 0 0 4 7 】

以上のことから、C-3は下記(II)のような構造の7-オクタデセニル-7,10-ヘニコサジエニルケトン(7-octadecenyl-7,10-henicosadienyl ketone)であることが判明した。

【 0 0 4 8 】

【化 1 1】



【 0 0 4 9 】

〔実施例 5〕 白米、玄米、発芽玄米のn-ヘキサン抽出物のPEP阻害活性の比較

発芽玄米において、n-ヘキサン抽出物から高いPEP阻害能が認められたことから、白米、玄米についてもn-ヘキサン抽出を行い、発芽玄米抽出と比較した。21時間蒸留水に浸漬した白米と玄米をn-ヘキサンでそれぞれ浸透抽出を行った。発芽玄米と同様、白米、玄米約450 g に対して、抽出溶媒1200mlの割合とした。浸透抽出を始めてから5日おきに、各抽出物のPEP阻害活性を測定した。このときの溶解濃度は、抽出物0.1 g に対して、40%ジオキサン水溶液 2 mlの割合とした。各溶媒抽出物によるPEP阻害活性の結果を図3に示した。

【 0 0 5 0 】

10日目から5日おきのPEP阻害能の比較を行った。白米と玄米には大きな差は認められなかったが、発芽玄米は、白米と玄米に比べ高い阻害活性を示した。こ

【0043】

【表4】

C-2 化合物の NMR スペクトル(CDCl₃)

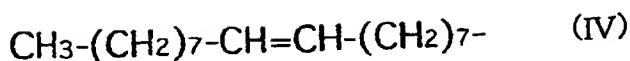
	¹³ C - NMR	DEPT	¹ H - NMR	H数
1	180.108	C		
2	130.242	CH	5.34	1H
3	130.049	CH × 2	5.34	2H
4	129.751	CH	5.34	1H
5	128.108	CH	5.34	1H
6	127.939	CH	5.34	1H
7	34.074	CH ₂ × 2	2.34	4H
8	31.934	CH ₂	1.28	2H
9	31.560	CH ₂	1.28	2H
10	29.796	CH ₂ × 2	1.28	4H
11	29.706	CH ₂ × 2	1.28	4H
12	29.613	CH ₂ × 2	1.28	4H
13	29.549	CH ₂ × 2	1.28	4H
14	29.376	CH ₂ × 2	1.28	4H
15	29.350	CH ₂ × 2	1.28	4H
16	29.343	CH ₂ × 2	1.28	4H
17	29.164	CH ₂ × 2	1.28	4H
18	29.093	CH ₂ × 2	1.28	4H
19	29.062	CH ₂ × 2	1.28	4H
20	27.247	CH ₂	2.02	2H
21	27.211	CH ₂	2.02	2H
22	27.184	CH ₂	2.02	2H
23	25.663	CH ₂	2.77	2H
24	24.695	CH ₂ × 2	1.63	4H
25	22.705	CH ₂	1.28	2H
26	22.596	CH ₂	1.28	2H
27	14.115	CH ₃	0.88	3H
28	14.072	CH ₃	0.88	3H

【0044】

¹³C-NMRのシグナルを低磁場から、1~28と番号を付け、HMBC、COSYより得られた相関シグナルを解析することにより、下式(IV~VII)のような部分構造を推定した。

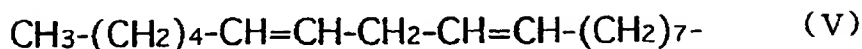
【0038】

【化6】



【0039】

【化7】

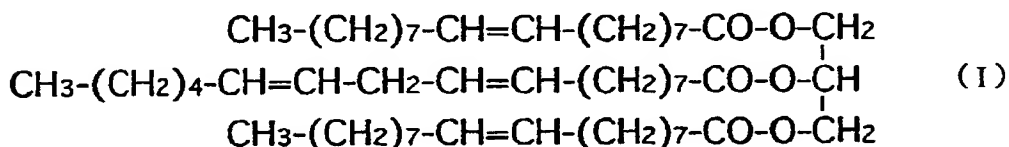


【0040】

さらに、光学活性がないことから、グリセリンの1位と3位に結合する脂肪酸は同じであり、¹H-NMRの積分比と二次元NMRから1位と3位の脂肪酸にはオレイン酸、2位の脂肪酸にはリノール酸が結合している下記(I)のような構造の1,3-ジオレオイル-2-リノレオイルグリセロール(1,3-dioleoyl-2-linoleoyl glycerol)であることが判明した。

【0041】

【化8】



【0042】

(2) C-3化合物の構造

C-3化合物のIRスペクトルでは 1700cm^{-1} にケトン基の特性吸収を認めた。そして、¹³C-NMRにおいて、表4のような28個の炭素のシグナルを認めた。

【0035】

【表3】

C-2化合物の NMR スペクトル(CDCI₃)

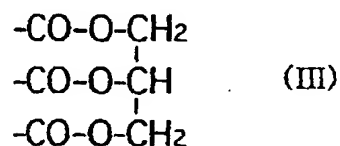
	¹³ C - NMR	DEPT	¹ H - NMR	H数
1	173.935	C		
2	173.901	C		
3	173.483	C		
4	130.898	CH	5.34	1H
5	130.692	CH×2	5.34	2H
6	130.655	CH	5.34	1H
7	130.388	CH	5.34	1H
8	130.361	CH	5.34	1H
9	128.776	CH	5.34	1H
10	128.760	CH	5.34	1H
11	128.588	CH	5.34	1H
12	128.579	CH	5.34	1H
13	69.592	CH	5.26	1H
14	62.783	CH ₂ ×2	4.28 4.13	4H
15	34.712	CH ₂ ×3	2.37	6H
16~28	32.587~29.772	CH ₂ ×26	1.3	52H
29	27.908	CH ₂ ×2	2.02	4H
30	27.883	CH ₂ ×2	2.02	4H
31	27.858	CH ₂ ×2	2.02	4H
32	26.235	CH ₂	2.7	2H
33	25.529	CH ₂ ×3	1.6	6H
34	23.358	CH ₂ ×2	1.3	4H
35	14.774	CH ₃ ×3	0.9	9H

【0036】

HMBC、COSYより得られた相関シグナルを解析することにより、C-2化合物は下記(III~IV)のような、部分構造を有するトリグリセリドであることが判明した。

【0037】

【化5】



抽出物(200mg)を少量のn-ヘキサンに溶解し、ガラスカラム(500mm×50mm)に6割程度まで充填したシリカゲル60(70~230メッシュ)の上部にアプライし、酢酸エチル/n-ヘキサン混合溶液を10%(100ml)から70%(100ml)まで、10%ごとに濃度を上げて溶出した。この溶出液は、薄層クロマトグラフィーを指標にC-1からC-6に分画した(表2)。これらは、濃縮後、n-ヘキサンに溶解して保存した。このうちC-2及びC-3を構造決定に供した。

【0033】

【表2】

薄層クロマトグラフィーにおける各画分由来スポットのRf値

Fraction	Rf 値				
C-1	0.90	0.84	0.80	0.70	0.66
C-2	0.66				
C-3	0.38				
C-4	0.38	0.36	0.30	0.26	
C-5	0.36		0.26		
C-6	0.20	0.16	0.10	0.04	0.02

【0034】

〔実施例4〕PEP阻害物質の構造決定

(1) C-2化合物の構造

C-2化合物のIRスペクトルでは1740cm⁻¹にカルボニル基の特性吸収が認められた。また、13-NMRによる解析により、表3のような35個の炭素シグナルが認められた。

【0030】

【表1】

PEP 阻害活性測定用反応系

	サンプル	サンプル コントロール	ブランク	ブランク コントロール
0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
サンプル溶液	125 μ L	125 μ L	0 μ L	0 μ L
基質溶液	125 μ L	125 μ L	125 μ L	125 μ L
ブレインキュベーション (30℃、5分)	行う	行う	行う	行う
反応停止液	0 μ L	2000 μ L	0 μ L	2000 μ L
インキュベーション (30℃、10分)	行う	行う	行う	行う
反応停止液	2000 μ L	0 μ L	2000 μ L	0 μ L
OD ₄₁₀	S	S'	B	B'

【0031】

得られた各吸光度B、B'、S、S'を以下の式に代入してPEP阻害活性を調べた。

$$\text{PEP阻害活性(\%)} = [(B - B') - (S - S')] \div (B - B') \times 100$$

図2に示したように、n-ヘキサン抽出物において、振盪抽出を始めてから10日目以降から、50%以上の高い阻害活性が確認された。他の溶媒抽出物は、20日間振盪抽出を行っても、5日目と同程度である50%以下の阻害活性を示した。この結果から、n-ヘキサン抽出物には、PEPを阻害する成分が他の溶媒の抽出物に比べて多く存在しているか、又は高いPEP阻害能を有する成分がn-ヘキサン抽出物にのみ含まれていると考えられた。また、蒸留水抽出物からではなく、有機溶媒抽出物から高い阻害活性が見られたことから、脂溶性物質がPEP阻害に関与していると考えられる。

【0032】

〔実施例3〕 n-ヘキサン抽出物からのPEP阻害物質の単離精製

短ければ抗健忘症効果は低いと評価する。

【0 0 2 8】

【実施例】

以下に、本発明を実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

〔実施例 1〕 発芽玄米からの PEP 阻害物質の抽出

発芽玄米から、各種溶媒を用いて PEP 阻害物質の抽出を行った。すなわち、まず、長野県上田市の農家から入手した玄米(銘柄：長野こしひかり)を水洗いし、マイコン電気発芽器((株)竹越製作所製)を使用し、21 時間で発芽させた。得られた発芽玄米約 450 g に対して、蒸留水、メタノール、酢酸エチル又は n-ヘキサン 1 200 ml を添加し、浸透抽出を行った。抽出開始後、5 日間ごとに、各抽出物を採取し、エバポレーターを用いて溶媒を蒸発させることにより抽出物を得た。

【0 0 2 9】

〔実施例 2〕 発芽玄米の各種溶媒抽出物中の PEP 阻害活性

PEP 阻害活性は、Yoshimoto らの方法 [T. Yoshimoto: Biochim. Biophys. Acta, 569 :184-189 (1979)] により測定した。すなわち、まず、実施例 1 において得られた各抽出物 0.1 g を 40% ジオキサン水溶液 2 ml に十分溶解しサンプル溶液を調製した。また、40% ジオキサンに 2 mM になるように Z-Gly-Pro-pNA を溶解することにより基質溶液を調製した。さらに 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に 0.175 U/ml になるようにフラボバクテリウム・メニンゴセプティカム由来 PEP (フナコシ社製) を溶解することにより酵素溶液を調製した。さらに、10 g の Triton X-100 を 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 95 ml に溶解することにより酵素反応停止液を調製した。このようにして得られた酵素活性測定用溶液を表 1 のような組成及び順番で反応を行い、反応終了後、各反応混液の OD₄₁₀ を測定した。

含の滅菌水で再溶解させる粉体であってもよい。これらの剤形は、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される乳化剤、懸濁剤などの添加剤を含有する。注射手法としては、例えば点滴静脈内注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、皮内注射などが挙げられる。

【0026】

投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数により異なり広範囲に変えることができる。通常成人一人当たり、有効成分の量としては、経口投与の場合、一回に1～10mgの範囲で、非経口投与の場合、一回に10～50mgの範囲で投与することが望ましい。

【0027】

4. 抗痴呆症効果の評価

本発明の化合物による抗痴呆症効果は、従来から行なわれているラットの迷走試験やラットの受動的回避学習試験[Int. Symp. On Pharmacology of Learning and Memory(1981)]により調べることができる。例えば、ラットの受動的回避学習試験では、まず格子状電極床と非難台からなる受動的回避試験箱内の非難台の上に、①本発明の化合物を投与したラット、②ネガティブコントロールとして生理食塩水を投与したラット、③ポジティブコントロールとしてPEP阻害活性を有することが公知のZ-プロリル-プロリナールを投与したラットを置き、ラットが床に降りたとき電流を流し、避難台に上がるまで流し続ける。そして、ラットが20秒以上台の上に留まっていた場合には、ラットは学習したとみなし、箱から取り出す。次いで、この学習ラットに健忘症誘発剤の臭化水素酸スコポラミンを投与することにより人為的に健忘症を起こさせる。次いで、再度、受動的回避試験箱内の避難台の上にそれらのラットを置き、台の上に留まっている時間を測定する。これにより、①の本発明の化合物を投与したラットの滞在時間が、②のネガティブコントロールラットの滞在時間に比べて有意に長い場合には、本発明の化合物は、抗健忘症効果があると評価し、滞在時間に有意差がない場合には、抗健忘症効果はないと評価する。また、抗健忘症効果があると評価した場合には、③のZ-プロリル-プロリナールを投与したラットの滞在時間と比較し、③よりも長ければZ-プロリル-プロリナールよりも抗健忘症効果は高いと評価し、③よりも

できる。

【0023】

3. 本発明のPEP阻害物質を有効成分として含む医薬組成物

本発明の化合物は、PEPを阻害する活性を有するため、抗アルツハイマー症剤、抗健忘症剤などの医薬組成物として経口投与又は非経口投与により患者に適用することができる。ここで、本発明の医薬組成物は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例としては、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

【0024】

本発明の医薬組成物を経口投与する場合には、錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤などの固形製剤、又は液剤、シロップ剤などの液体製剤などの剤形で用いることができる。特に、顆粒剤及び散剤は、カプセル剤として単位量投与形態とすることができ、液体製剤の場合は、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。これら剤形のうち、固形製剤は、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される結合剤、賦形剤、崩壊剤、湿潤剤、滑沢剤などの添加物を含有する。また、液体製剤は、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される安定剤、緩衝剤、保存剤、芳香剤、着色剤、矯味剤などの添加剤を含有する。

【0025】

また、本発明の医薬組成物を非経口投与する場合には、注射剤、座剤などの剤形で用いることができる。特に、注射剤の場合は、通常単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供され、使用する際には適当な担体、例えば発熱物質不

【0020】

2. 本発明のPEP阻害物質の食品素材としての利用

本発明のPEP阻害物質は、PEPによる脳機能関連ペプチドの分解に起因するアルツハイマー症や健忘症などの原因となる脳機能障害の予防や改善に適した特定保健用食品の製造に用いることができる。すなわち、本発明のPEP阻害物質は、固体状食品、ゼリー状食品、液状食品など様々な形態の食品に添加することができる。ここで、固体状食品としては、パン生地；せんべい、ビスケット、クッキー等の焼き菓子用生地；そば、うどん等の麺類；かまぼこ、ちくわ等の魚肉製品；ハム、ソーセージ等の畜肉製品；粉ミルクなどが挙げられる。また、ゼリー状食品としては、フルーツゼリー；コーヒーゼリーなどが挙げられる。さらに、液状食品としては、茶；コーヒー；紅茶；発酵乳；乳酸菌飲料などが挙げられる。特に玄米茶として、広く飲用に供されてきた茶は、米の特有の風味を有し日常的に消費される茶の中でも、大きな部分を占めている。玄米茶は、通常、蒸した玄米及び／又は白米を乾燥し、そして焙煎することによって製造するが、精白米の代わりに、発芽玄米を用いることによって、痴呆予防効果のある玄米茶を製造することができる。

【0021】

本発明のPEP阻害物質を、上記食品に添加する場合、単離精製した形態以外にも、PEP阻害物質を含有する米、玄米又は発芽玄米の粗抽出物あるいは粉末化物などの形態で使用するすることができる。ここで食品への添加量としては、単離精製したものをを用いる場合には0.01～1重量%、好ましくは0.1～0.5重量%、粗抽出物を用いる場合には0.001～0.1重量%、好ましくは0.005～0.05重量%、粉末化物を用いる場合には1～10重量%、好ましくは2～5重量%である。添加量は、食品の種類、形状、食品対象者等により変化するため上記範囲外で添加することもできる。

【0022】

また、発芽させた玄米は白米や発芽させる前の玄米と比べて顕著にPEP阻害物質の含有量が上昇しているため、アルツハイマー症又は健忘症予防用に常食として、発芽玄米そのものを白米の代わりに、餅や粥などの食品として用いることも

穀類成分のPEP阻害活性は、分子内部にプロリン残基を有する合成基質又は天然基質を阻害物質含有サンプルの存在下又は非存在で分解した場合の、基質分解率の差を調べることによって測定することができる。ここで、用いることができる合成基質としては、Z-Gly-Pro-p-ニトロアニリド(Z-Gly-Pro-pNA)、Z-Gly-Pro-2-ナフチルアミド、Z-Gly-Pro-4-メチルクマリニアミドなどのC末端に分解指示物質を結合したもの、天然基質としてはオキシトシン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンなどの天然のペプチドを用いることができる。また、PEPはフラボバクテリウム・メニンゴセプティカム(*Flavobacterium meningosepticum*)由来のもの(フナコシ社製)やラットやマウスなど実験動物から単離精製したものなどを用いることができる。

【0018】

(3) PEP阻害成分の単離精製

上記(1)に記載の採取源からのPEP阻害成分の分離は以下のようにして行うことができる。すなわち、まず採取源をそのままあるいは乳鉢やボールミルなどを用いて粉碎する。次いで、溶媒(例えば、蒸留水、メタノール、酢酸エチル、n-ヘキサンなど)で浸透抽出する。そして、得られた抽出液をエバポレーターなどを用いて濃縮乾固した後、適当な溶媒に溶解する。次いで、溶解物をシリカゲルなどを担体とするクロマトグラフィーカラムにアプライした後、適当な溶媒(例えば酢酸エチル/n-ヘキサン混合液など)を用いて溶出し、PEP阻害活性のある画分を分取することにより粗精製する。さらに粗精製物を薄層クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーなどにかけることによってPEP阻害物質を単離することができる。

【0019】

(4) 構造決定

上記(3)において単離された化合物は、IRスペクトル、 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR、相関二次元NMR(COSY; correlation spectroscopy)などを組み合わせた機器分析によって構造を決定することができる。なお、一旦本発明の化学構造が決定されると、その後は、化学合成によって本発明のPEP阻害物質を得ることができる。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明のPEP阻害物質は、従来のPEP阻害剤とは異なり米から単離精製されたケトン又はグリセリドである。この物質は以下のようにして単離精製することができる。

【0015】

1. 本発明のPEP阻害剤

(1) PEP阻害物質の採取源

PEP阻害物質の採取源としては、米、麦、トウモロコシ、大豆、マイロ、そば、あわ、ひえ、きび、ごまなどの穀類、好ましくは玄米、最も好ましくは発芽玄米が挙げられる。米糠、米胚芽、米糠油などの米由来のものも用いることができる。例えば、米の銘柄としては、こしひかり、あきたこまち、中国137号などが挙げられるが、本発明においてはこれらに限定されない。また、発芽玄米は、原料の玄米を、5～50℃(好ましくは30～34℃)の範囲の温度に調整した水又は温水に一定時間浸漬させることにより調製することができる。具体的には、まず玄米を温水中に浸し玄米粒が十分吸水したところで水又は温水浴から取り出して、高湿度(例えば、相対湿度100%)の雰囲気中に5時間～5日間、好ましくは10～24時間放置して発芽させる。ここで、温水に殺菌効果を有するオゾンを経溶解させたものを用いることにより、浸漬中の一般細菌や大腸菌、ウイルス等の増殖を抑えることができる。オゾン溶解水の玄米への供給方法としては、オゾン発生器(例えばオゾン社製OZ-2-A100-30型オゾン発生装置)によって発生したオゾンを含む空気を、玄米を収納する温水浴中に直接曝気する方法やオゾンを経溶解する温水を貯留槽から循環させる方法などが挙げられる。

【0016】

発芽の程度は、胚の部分に1mm前後の膨らみ又は突部が視認できる程度の状態が理想的である。発芽が完成した時点で、玄米を、乾燥又は加熱処理するか、あるいは6℃以下に冷蔵保存又は凍結保存する。

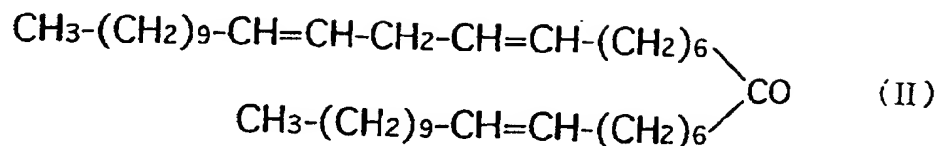
【0017】

(2) 穀類成分のPEP阻害活性の測定

さらに、本発明は、次式 (II) :

【 0 0 0 9 】

【化 3】



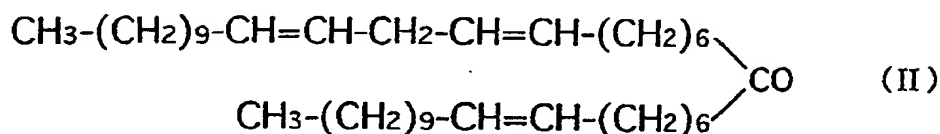
【 0 0 1 0 】

で示される化合物である。

さらに、本発明は、穀類より抽出・精製することを特徴とする次式 (II) :

【 0 0 1 1 】

【化 4】



【 0 0 1 2 】

で示される化合物の製造方法である。ここで、穀類としては、米、麦、トウモロコシ、大豆、マイロ、そば、あわ、ひえ、きび、ごまなどが挙げられる。さらに、米としては発芽させたもの(例えば、発芽玄米)を用いることができる。

さらに、本発明は、上記化合物を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤である。

【 0 0 1 3 】

さらに、本発明は、上記化合物を有効成分として含有する脳機能障害予防用及び／又は改善用食品である。

さらに、本発明は、プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する脳機能障害予防用及び／又は改善用発芽玄米である。

さらに、本発明は、プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する発芽玄米を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品である。

以下本発明を詳細に説明する。

【0005】

ところで、慢性疾患の増加や高齢化社会の到来から、日常的な食生活を通じて、成人病や老年病を予防することに関する意識が高まっている。現在までに、高血圧や便秘など特定の疾患を有する患者に適した食品がいくつか上市されている。しかし、老人性痴呆症や健忘症の患者に適した食品は知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、穀類の抽出物を有効成分として含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法、穀類から抽出・精製されたプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する化合物、該化合物の製造方法、該化合物を含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該化合物を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品、プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する脳機能障害予防用及び／又は改善用発芽玄米、及び該発芽玄米を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、米中にPEPを特異的に阻害する成分を見出し、該成分を発芽玄米から単離精製することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、穀類の抽出物を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤である。ここで、穀類としては、米、麦、トウモロコシ、大豆、マイロ、そば、あわ、ひえ、きび、ごまなどが挙げられる。さらに、米としては発芽させたもの(例えば、発芽玄米)を用いることができる。

【0008】

さらに、本発明は、穀類から水及び／又は有機溶媒(例えば、ヘキサンなど)で抽出することを特徴とするプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法である。ここで、穀類としては、米、麦、トウモロコシ、大豆、マイロ、そば、あわ、ひえ、きび、ごまなどが挙げられる。さらに、米としては発芽させたもの(例えば、発芽玄米)を用いることができる。

原因で起こる痴呆症(非神経細胞疾患性痴呆症)とに分けられる。神経細胞疾患性痴呆症の一つに、アルツハイマー症(AD)がある。AD患者は、徐々に脳を蝕まれ、徘徊、失禁、錯覚、妄想、記憶障害、人格崩壊などの症状が現れ、個人差があるものの発病後2年から15年で死に至る。AD患者は、運動能力にはあまり障害が現れないため徘徊などを繰り返す場合があり、介護者には重い負担となっている。ADの原因は、完全には解明されていないものの、幾つかの病理学的所見が認められている。例えば、ADの患者の脳には、著しい脳の萎縮とともに、①脳内の生理活性物質の量的異常、②神経細胞外に沈着する β アミロイドペプチドを主成分とした老人斑、③神経細胞内に蓄積する高度にリン酸化されたタウタンパク質を主成分とした神経原繊維変化が見られる。

【0003】

①の脳内の生理活性物質の量的異常の原因として、プロリルエンドペプチダーゼ(PEP)による脳機能関連ペプチド分解の亢進が考えられている。PEPは、ペプチド鎖中のプロリンに特異性を有し、図1のようにプロリンのカルボキシル基側でペプチド鎖を切断するセリンプロテアーゼである。PEPは神経伝達物質であるサブスタンスP、ニューロテンシン、記憶に関係するバソプレッシンそしてオキシトシンなど、脳を正常に保たせる働きのあるプロリンを含む脳機能関連ペプチドを切断して不活性化することにより、脳機能関連ペプチドを減少させ、脳機能を攪乱し、ADを引き起こすと推定されている。実際に、痴呆症患者のバソプレッシン量は、正常人よりも少ないことが明らかとなっている[BIOINDUSTRY 4: 788-796(1987)]。

【0004】

従って、PEPを特異的に阻害する物質は、ADを初めとして、PEPに起因する様々な障害(例えば健忘症)の予防や治療に応用できる可能性が期待され、既に、N-アシルピロリジン誘導体(特開昭61-37764、特開昭61-183297、特開昭61-238775)、ピロリジンアミド誘導体[特公平7-64834]などの合成阻害剤や、酒粕由来のPEP阻害ペプチド[特開平10-77300]が報告されている。しかし、安全性などの面から天然素材由来のPEP阻害物質が求められている。

で示される化合物の製造方法。

【請求項 10】 穀類が米、麦、トウモロコシ、大豆、マイロ、そば、あわ、ひえ、きび及びごまからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 9 記載の製造方法。

【請求項 11】 米が発芽玄米である請求項 10 記載のプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法。

【請求項 12】 請求項 8 記載の化合物を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤。

【請求項 13】 請求項 8 記載の化合物を有効成分として含有する脳機能障害予防用及び／又は改善用食品。

【請求項 14】 プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する脳機能障害予防用及び／又は改善用発芽玄米。

【請求項 15】 プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する発芽玄米を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、穀類の抽出物を有効成分として含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法、穀類から抽出・精製されたプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する化合物、該化合物の製造方法、該化合物を含むプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤、該化合物を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品、プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を有する脳機能障害予防用及び／又は改善用発芽玄米、及び該発芽玄米を含む脳機能障害予防用及び／又は改善用食品に関する。

【0002】

【従来の技術】

高齢化社会の到来に伴い、老人性痴呆症は社会的に、深刻な問題となっている。老人性痴呆症は、主に脳神経細胞自体の変調が原因で起こる痴呆症(神経細胞疾患性痴呆症)と、脳血管に血栓が生じるなど脳神経細胞以外の脳組織の変調が

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 穀類の抽出物を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤。

【請求項 2】 穀類が米、麦、トウモロコシ、大豆、マイロ、そば、あわ、ひえ、きび及びごまからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 1 記載のプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤。

【請求項 3】 米が発芽させたものである請求項 2 記載のプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤。

【請求項 4】 穀類から水及び／又は有機溶媒で抽出することを特徴とするプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法。

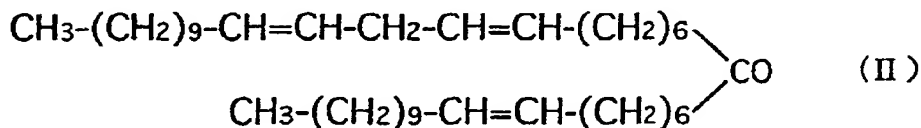
【請求項 5】 穀類が米、麦、トウモロコシ、大豆、マイロ、そば、あわ、ひえ、きび及びごまからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 4 記載のプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法。

【請求項 6】 米が発芽させたものである請求項 5 記載のプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の製造方法。

【請求項 7】 有機溶媒がヘキサンである請求項 4 記載の製造方法。

【請求項 8】 次式 (II) :

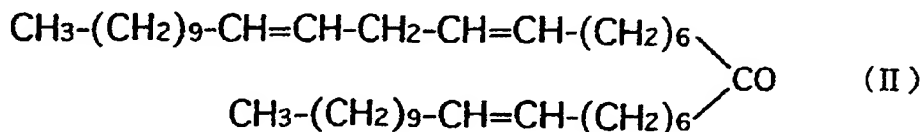
【化 1】



で示される化合物。

【請求項 9】 穀類より抽出・精製することを特徴とする次式 (II) :

【化 2】



【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99-0084

【提出日】 平成11年 5月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A23L 1/03
C11B 1/10

【発明の名称】 プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤

【請求項の数】 15

【発明者】

 【住所又は居所】 長野県伊那市西箕輪 3900-448

 【氏名】 茅原 紘

【発明者】

 【住所又は居所】 長野県上田市大字中野 938

 【氏名】 塚原 菊一

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県福山市南蔵王町 1-8-33 レオパレス南蔵王
204号

 【氏名】 稲垣 毅

【特許出願人】

 【識別番号】 597050059

 【氏名又は名称】 ドーマー株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

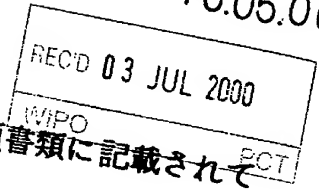
 【識別番号】 100096183

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石井 貞次

EKV
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/926566
PCT/JP00/03135
16.05.00



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 5月19日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第138791号

出願人
Applicant(s):

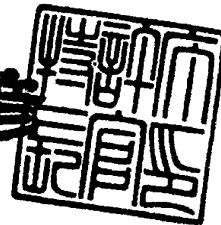
ドーマー株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3045086